

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. August 2001 (30.08.2001)

PCT

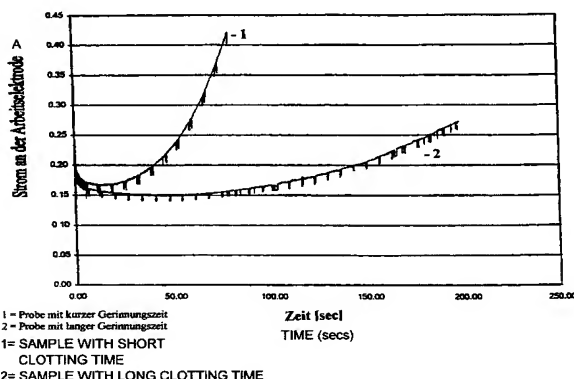
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/63271 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 27/327**, 33/86, C12Q 1/00 (71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **ROCHE DIAGNOSTICS GMBH** [DE/DE]; 68298 Mannheim (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/01848 (72) **Erfinder; und**
- (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 2001 (19.02.2001) (75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **UNKRIG, Volker** [DE/DE]; Stahlbuehling 27, 68526 Ladenburg (DE). **MARQUANT, Michael** [DE/DE]; Ida-Dehmel-Ring 84, 68309 Mannheim (DE). **HINDELANG, Fritz** [DE/DE]; Kurweg 74, 67316 Carlsberg (DE). **KOTZAN, Holger** [DE/DE]; Breslauer Str. 77, 68526 Ladenburg (DE). **HORN, Carina** [DE/DE]; Alte Bergstrasse 91, 64665 Alsbach-Haehnlein (DE). **NORTMEYER, Christine** [DE/DE]; Kettelerweg 6, 68305 Mannheim (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 07 910.5 21. Februar 2000 (21.02.2000) DE
60/184,059 22. Februar 2000 (22.02.2000) US
100 16 775.6 4. April 2000 (04.04.2000) DE
- (74) **Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH**; Patentabteilung, 68298 Mannheim (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** ELECTROCHEMICAL SENSOR FOR DETERMINING BLOOD CLOTTING, CORRESPONDING SYSTEM FOR MEASURING BLOOD CLOTTING AND METHOD FOR DETERMINING BLOOD CLOTTING

(54) **Bezeichnung:** ELEKTROCHEMISCHER SENSOR ZUR BESTIMMUNG DER BLUTGERINNUNG, EIN ENTSPRECHENDES BLUTGERINNUNGSMESSSYSTEM SOWIE EIN VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER BLUTGERINNUNG



A... CURRENT APPLIED TO WORKING ELECTRODE

(57) **Abstract:** The invention relates to a dry chemical based electrochemical sensor for determining blood clotting. The inventive sensor comprises at least 2 electrodes on an inert support, in addition to a dry reagent. The invention is characterized in that the reagent contains a thrombin substitute consisting of a peptide radical which can be cleaved off from thrombin and which is amidically linked to a phenylenediamine radical by the carboxyl end thereof. The invention also relates to a system for measuring blood clotting, comprising one such sensor and a current measurement device. The invention further relates to a method for determining blood clotting with the aid of the inventive sensor and a reagent for determining blood clotting, comprising a thrombin substitute consisting of a peptide radical which can be cleaved off from thrombin and which is amidically linked to a phenylenediamine radical by the carboxyl end thereof. Said reagent is characterized that it also contains a dye oxidoreductase, such as glucose dye oxidoreductase.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft einen elektrochemischen Sensor auf trockenchemischer Basis zur Bestimmung der Blutgerinnung, der auf einem inerten Träger mindestens 2 Elektroden aufweist, sowie ein trockenes Reagenz, dadurch gekennzeichnet, dass das Reagenz ein Thrombinsubstrat enthält, das aus einem Peptidrest besteht, der von Thrombin

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/63271 A1



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

abgespalten werden kann, und über das Carboxylende amidisch an einen Phenylendiaminrest gebunden ist sowie ein Blutgerinnungsmesssystem enthaltend einen solchen Sensor und ein Strommessgerät, ein Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung mit erfindungsgemäsem Sensor und ein Reagenz zur Bestimmung der Blutgerinnung enthaltend ein Thrombinsubstrat, das aus einem Peptidrest besteht, der von Thrombin abgespalten werden kann und über das Carboxylende amidisch an einen Phenylendiaminrest gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, dass es auch eine Dye-Oxidoreductase, wie beispielsweise Glucose-Dye-Oxidoreductase enthält.

Elektrochemischer Sensor zur Bestimmung der Blutgerinnung, ein entsprechendes Blutgerinnungsmeßsystem sowie ein Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung

5

Die Erfindung betrifft einen Sensor auf trockenchemischer Basis zur Bestimmung der Blutgerinnung, der auf einem inerten Träger mindestens 2 Elektroden aufweist, sowie ein trockenes Reagenz. Außerdem betrifft die Erfindung ein Blutgerinnungsmeßsystem enthaltend einen elektrochemischen Sensor und ein Strommeßgerät. Schließlich betrifft 10 die Erfindung auch ein Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung mittels eines elektrochemischen Sensors.

In EP-B 0 441 222 werden ein Verfahren und Sensorelektrodensystem zur elektrochemischen Bestimmung eines Analyts oder einer Oxidoreductase beschrieben. Die Patentschrift offenbart die Rolle einer reduzierbaren Substanz als Elektronenüberträger bei der 15 Redoxreaktion eines zu bestimmenden Analyts auf eine Elektrode. Ein typischer Analyt ist Glucose, Lactat oder Redoxenzym, wie beispielsweise Glucose-Dehydrogenase oder Lactat-Dehydrogenase.

Ein elektrochemisches Verfahren zur Bestimmung von Proteasen und Antiproteasen ist aus EP-B 0 018 002 bekannt. Es wird dort ein Proteasen- oder Antiproteasensubstrat aus 20 einem Oligopeptid, an das ein aromatisches oder heterocyclisches Amin oder Polyamin gebunden ist, eingesetzt. Das zu bestimmende Enzym spaltet die Bindung zwischen der carboxyterminalen Aminosäure und dem Amin oder Polyamin und die Menge des freigesetztenamins oder Polyamins wird elektrochemisch bestimmt. Hier wird die Bestimmung von frei beweglichen Bestandteilen der Blutgerinnungskaskade in Lösung 25 beschrieben.

Aus C. Bisson et al., "A microanalytical device for the assessment of coagulation parameters in whole blood", Technical Digest Solid-State Sensor and Actuator Workshop, Hilton Head Island, South Carolina, USA, June 8-11, 1998, ist ein elektrochemischer Sensor für die Gerinnungsdetektion bekannt. Diese Publikation 30 beschreibt generell die Möglichkeit, elektrochemische Gerinnungssensoren mit

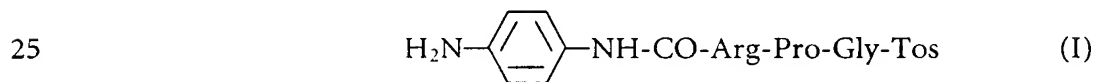
amperometrischer Detektion einzusetzen. Details über die verwendeten Substrate werden beispielsweise nicht offenbart. Zudem sind die beschriebenen Elektroden und Testdevices aufwendig herzustellen und somit für einen Massenmarkt unattraktiv.

5 Generell bleibt festzuhalten, dass sich im Stand der Technik jedoch kein einfacher und zuverlässiger Ansatz für elektrochemische Gerinnungssensoren und entsprechende Verfahren zur Gerinnungsdetektion findet.

Die vorliegende Erfindung stellt zur Lösung dieses Problems einen elektrochemischen Sensor, ein Blutgerinnungsmeßsystem und ein Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung zur Verfügung, wie sie in den unabhängigen Patentansprüchen beschrieben
10 sind. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Der erfindungsgemäße Sensor ist ein Analyseelement auf trockenchemischer Basis. Der Sensor enthält mindestens zwei Elektroden, von denen mindestens eine Elektrode eine sogenannte Arbeitselektrode ist. Er enthält in einer bevorzugten Ausführungsform keine klassische Referenzelektrode, wie beispielsweise eine Ag/AgCl-Referenzelektrode,
15 sondern lediglich mindestens eine Arbeits- und eine Gegenelektrode. Die Elektroden können aus allen gängigen Elektrodenmaterialien, beispielsweise Metallen, Edelmetallen, Legierungen oder Graphit aufgebaut sein, vorzugsweise aus Edelmetallen, wie Gold oder Palladium, oder Graphit. Die unterschiedlichen Elektroden des Sensors können aus gleichen oder unterschiedlichen Materialien bestehen. In einer besonders bevorzugten
20 Ausführungsform enthält der Sensor eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode, die beide aus Palladium bestehen.

Das trockene Reagenz des erfindungsgemäßen Sensors enthält beispielsweise die Verbindung (I)



als Thrombinsubstrat. Dabei bedeutet Arg Arginin, Pro Prolin und Gly Glycin; Tos entspricht der Aminoschutzgruppe Tosyl. Generell sind als Peptidreste des erfindungsgemäßen Thrombinsubstrats alle Reste möglich, die von Thrombin abgespalten werden können, so daß ein elektrochemisch bestimmbares Phenylendiamin
30 aus dem Substrat freigesetzt wird.

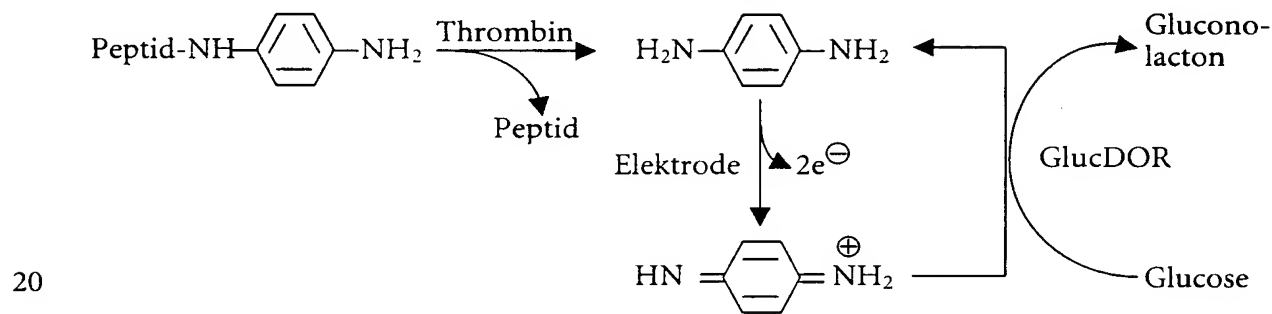
Das Enzym Thrombin ist die letzte Protease der Gerinnungskaskade und wird erst im Verlauf der Blutgerinnung aus dem Protein Prothrombin gebildet. Deshalb ist es möglich, die Verklumpung des Blutes durch Messung der Enzymaktivität des Thrombins zu verfolgen und so die Gerinnungszeit zu bestimmen.

- 5 Bei der Spaltung des Thrombinsubstrats entsteht ein p-Aminoanilin (Phenylendiamin), das an der Arbeitselektrode des Sensors oxidiert wird, wie es in EP-B 0 441 222 beschrieben ist. Die frei werdenden Elektronen werden detektiert. Grundsätzlich sind als elektrochemisch detektierbarer Teil des erfindungsgemäßen Thrombinsubstrats alle die Verbindungen einsetzbar, die als Elektronenüberträger (oder Mediator) 2. Art in EP-B 0
- 10 441 222 beschrieben sind.

Besonders vorteilhaft hat es sich bei der vorliegenden Erfindung herausgestellt als Verstärkersystem dem Reagenz Glucose-dye-oxidoreductase (GlucDOR) zuzusetzen, welches im zu untersuchenden Blut vorkommende Glucose oxidiert und hierzu den durch die Thrombinaktivität freigesetzten Elektronenüberträger 2. Art als Elektronenakzeptor

15 benutzt.

Die Reaktionen finden nach folgendem Prinzip statt:



- Das primäre Oxidationsprodukt des Elektronenüberträgers 2. Art ist ein Chinodiiimin, welches mittels einer Dye-Oxidoreductase, wie beispielsweise Glucose-Dye-Oxidoreductase (GlucDOR) in p-Aminoanilin rückgeführt werden kann und damit erneut Elektronen an der Arbeitselektrode abgeben kann. Somit ist eine beträchtliche
- 25 Verstärkung des ursprünglichen Signals möglich. Neben GlucDOR gibt es weitere Enzyme (wie z. B. Alkoholdehydrogenase oder Oxidasen wie Glucoseoxidase oder Laktatoxidase), die das Chinodiiimin zum Phenylendiamin umsetzen können. Hierfür sind spezielle weitere Substrate (entsprechend der Glucose für GlucDOR) notwendig (wie z. B. Alkohole für das Enzym Alkoholdehydrogenase oder Laktat für

Laktatoxidase), die dann gegebenenfalls in geeigneten Mengen in die Reagenzrezeptur eingebracht werden.

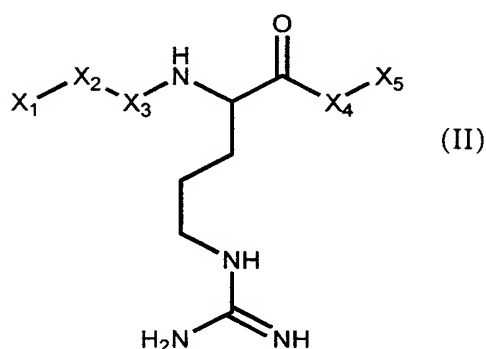
Die elektrochemische Bestimmung der Blutgerinnung erfolgt vorzugsweise quasi-potentiostatisch, bevorzugt mit einem 2-Elektrodensystem, bei dem die eine Elektrode gleichzeitig als Referenz- und Gegenelektrode, die andere Elektrode als Arbeitselektrode geschaltet ist. An dieses 2-Elektrodensystem wird eine konstante Spannung angelegt und der Strom über die Zeit gemessen. Dieses Verfahren wird auch als amperometrisches Meßverfahren bezeichnet. Für die Bestimmung der Blutgerinnungszeit wird der zeitliche Stromverlauf erfasst und ermittelt, nach welcher Zeitspanne ab dem Start der Gerinnungsmessung der gemessene Strom einen vorbestimmten Schwellenwert überschreitet. Diese Zeitspanne ist ein Maß für die Gerinnungszeit.

Neben dem beschriebenen amperometrischen Meßverfahren können auch voltametrische Meßverfahren eingesetzt werden. Hierbei wird keine konstante Spannung zwischen den Elektroden geregelt, sondern die Spannung wird linear von einem Startwert zu einem Endwert verändert und anschließend wieder zum Startwert zurück gefahren. Dieser Vorgang kann mehrfach über die gesamte Meßdauer wiederholt werden.

Beim voltametrischen Verfahren wird der Strom gegen die Spannung aufgetragen und man erhält dann entsprechend den Wiederholungen ineinandergeschachtelte Strom-Spannungskurven (Zyklovoltamogramme). Bei geeignetem Spannungsbereich bilden sich Oxidationspeaks und Reduktionspeaks des Elektronenüberträgers in diesen Kurven ab. Die Höhe dieser Peaks ist direkt proportional der Konzentration des Elektronenüberträgers, sofern nicht weitere redox-aktive Substanzen im überdeckten Potentialbereich mit oxidiert oder reduziert werden und damit einen zusätzlichen Strombeitrag liefern. Bei der Messung einer Konzentrationsänderung kann eine solche Störung gegebenenfalls vernachlässigt werden.

Trägt man nun die Stromwerte der Peak-Maxima oder die durch die Kurven eingeschlossenen Flächen (die dem Ladungsumsatz entsprechen) der einzelnen Strom-Spannungsschleifen über die Zeit auf, erhält man ebenfalls ein Bild der Konzentrationsänderung des Elektronenüberträgers über die Meßdauer in einem durch die Zyklusdauer gegebenen Zeitraster. Diese Information kann dann - wie bei den amperometrischen Verfahren - zur Bestimmung der Blutgerinnungszeit herangezogen werden.

Für einen Gerinnungstest, der auf die Bestimmung der Enzymaktivität einer Protease, z. B. Thrombin, zurückzuführen ist, werden Oligopeptid-Derivate der folgenden allgemeinen Formel (II) eingesetzt:



Dabei stellen X_1, X_2 und X_3 natürliche oder künstliche Aminosäuren inklusive eventueller Schutzgruppen dar. Die Sequenz $\text{X}_1-\text{X}_2-\text{X}_3$ wird je nach gewünschter Anwendung ausgewählt, beispielsweise für die Erkennung durch Thrombin, und ist für unterschiedliche Zwecke in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben worden. (vgl. z. B. U. Becker et al., Clin. Chem., 30 (4), 524-528 (1984); M.-C. Bouton et al., Eur. J. Biochem., 229 (2), 526-532 (1995); H. D. Bruhn et al., Hämostaseologie, 15 (1), 54-56 (1995); E. De Candia et al., Thromb. Haemostasis, 77 (4), 735-740 (1997); P.L. Coleman et al., Clin. Chem., 29 (4), 603-608 (1983); J. DiMaio et al., J. Med. Chem., 35, 3331-3341 (1992); A. Frigola et al., J. Clin. Pathol., 32 (1), 21-25 (1979); P. J. Gaffney et al., Thromb. Res., 10 (4), 549-556 (1977); J. Hofsteenge et al., Biochem. J., 237, 243-251 (1986); R. Lottenberg et al., Thromb. Res., 28, 313-332 (1982); M.K. Ramjee, Anal. Biochem., 277, 11-18 (2000); J. J. Slon-Usakiewicz et al., Biochem. 36, 13494-13502 (1997); S. A. Sonder et al., Clin. Chem., 32 (6), 934-937 (1986); C. Soria et al., Thromb. Res., 19 (3), 435-440 (1980); T. Steinmetzer et al., J. Med. Chem., 42, 3109-3115 (1999); A. Tripodi et al., Clin. Chem., 30 (8), 1392-1395 (1984); J. I. Witting et al., Thromb. Res., 46 (4), 567-574 (1987); EP-B 0 018 002; US 5,108,890; US 5,190,862; EP-A 0 280 610; EP-B 0 144 744) Darüber hinaus werden diese Aminosäuresequenzen teilweise auch von verschiedenen Firmen zur Erkennung unterschiedlicher Gerinnungsfaktoren kommerziell angeboten, beispielsweise von Pentapharm LTD, Basel, Schweiz oder von Chromogenix Germany, Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Deutschland.

An die Aminosäuresequenz $X_1-X_2-X_3$ ist ein Molekülteil X_4-X_5 als Abgangsgruppe (leaving group) geknüpft, welcher durch die proteolytische Aktivität des Gerinnungsfaktors, beispielsweise also Thrombin, abgespalten wird. Der Molekülteil X_4-X_5 , der zur Detektion der proteolytischen Aktivität genutzt wird, ist je nach gewünschtem

5 Detektionsprinzip farbig (für die photometrische Bestimmung), fluoreszierend (siehe hierzu unter anderem M. K. Ramjee, Anal. Biochem., 277, 11-18 (2000)) oder elektroaktiv (vgl. EP-B 0 018 002).

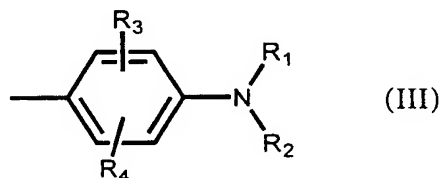
Der Molekülteil X_4-X_5 ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung elektroaktiv, das heißt an einer Elektrode unter Elektronenabgabe oder -aufnahme umsetzbar. Vorzugsweise

10 weist X_4-X_5 ein Oxidationspotential von maximal 350mV gegen eine Ag/AgCl-Elektrode auf und kann durch eine elektrochemische Messung detektiert werden.

Dabei kann X_4 als Verknüpfungsatom bzw. -gruppe zur Oligopeptidsequenz N oder NH sein.

Der Molekülteil X_5 kann dabei folgende Struktur (III) haben,

15

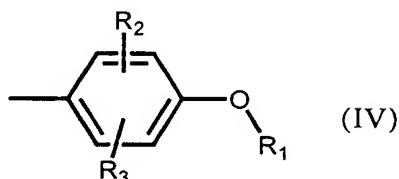


wobei R_1 und R_2 unabhängig voneinander Alkyl, Hydroxyalkyl, Alkoxyalkyl, Phosphoramidalkyl, Polyhydroxyalkyl, Sulfonalkyl, oder Wasserstoff sind, und

20 R_3 und R_4 OH, O-Alkyl, Alkyl, H, Halogen, NR_1R_2 , CO_2R , $CONR_1R_2$, SR_1 , NR_1-CO-R_1 , O-CO- R_1 , H sind.

Peptidsubstrate dieses Typs für $X_4 = N$ oder NH sind beispielsweise in den folgenden Patenten bzw. Patentanmeldungen beschrieben: JP-A 56042597; JP-A 58090535; WO-A 86/01209, US 5,059,525; JP-A 61112096; JP-A 03157353.

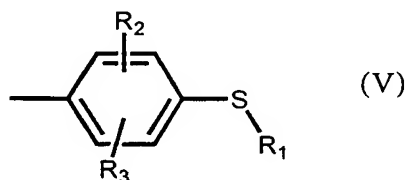
Alternativ kann X_5 folgende Struktur (IV) aufweisen:



in der R_1 bis R_3 die oben für die Formel III angegebene Bedeutung haben.

Peptidsubstrate dieses Typs sind für $X_4 = NR$ bekannt (vgl. hierzu beispielsweise JP-A 03271299; EP-B 0 350 915; P. Kurzhals et al., Acta Pharm. Nord., 1 (5), 269-78 (1989);
 10 US 4,797,472; EP-B 0 224 254; WO-A 87/05608; EP-B 0 170 797; EP-B 0 167 980; EP-B 0 152 872; EP-B 0 076 042; JP-A 52148032).

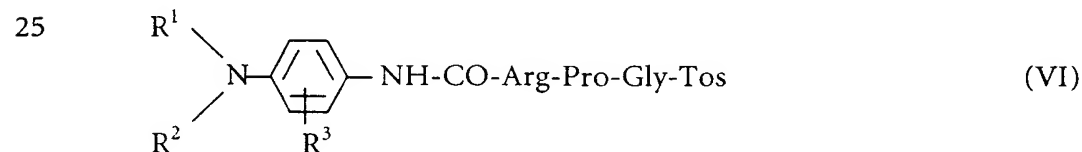
Alternativ kann X_5 folgende Struktur (V) aufweisen:



in der R_1 bis R_3 die oben zu Formel III und IV angegebene Bedeutung haben.

Peptidsubstrate dieses Typs mit $X_4 = NR, O$ sind bekannt (vgl. hierzu beispielsweise T. Morimoto et al., Pept. Chem., Vol. Date 1989, 27th., 387-390 (1990); N. Nishino et al.,
 20 Pept. Chem., Vol. Date 1988, 26th, 21-24 (1989); B. J. Johnson et al., J. Org. Chem., 35 (1), 255- 257 (1970)).

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Peptidsubstrat ein Thrombinsubstrat der allgemeinen Formel VI



wobei R^1 einen Alkylrest oder Wasserstoff,
 R^2 einen Hydroxyalkylrest oder Wasserstoff und
 30 R^3 Wasserstoff, Halogen, Alkoxy oder Alkylthio bedeutet.

Insgesamt kommen als Proteasesubstrate Verbindungen in Frage, die aus einem Peptidrest bestehen, der von einer Protease des Blutgerinnungssystems abgespalten werden kann und über das Carboxylende amidisch an substituierte Aniline, insbesondere an einen Phenylendiaminrest, gebunden ist.

- 5 Neben sogenannten Globaltests, bei denen die Gerinnungszeit als solche bestimmt wird und die zu diesem Zweck die Aktivität der Protease Thrombin bestimmen, können mit entsprechenden, dem Fachmann bekannten alternativen Substraten andere Gerinnungstests, z. B. ein anti-Faktor Xa-Test, oder die Bestimmung von einzelnen Gerinnungsfaktoren realisiert werden. Hierfür ist es notwendig, den Peptidteil des
- 10 Substrats an die zu bestimmende Protease anzupassen. Für die erfindungsgemäße elektrochemische Bestimmung der Gerinnung oder einzelner Gerinnungsfaktoren ist es wichtig, dass ein elektrochemisch bestimmbares Abspaltprodukt des Peptidsubstrats gebildet und nachgewiesen wird.

- Zu den Globaltests zählen insbesondere die folgenden Tests: PT (Prothrombinzeit-Test),
- 15 aPTT (aktivierte partielle Prothrombinzeit-Test) und ACT ("activated clotting time"-Test).

- Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert. Sämtliche Beispiele wurden für Vollblute als Probenmaterialien beschrieben. Die erfindungsgemäßen Sensoren und Verfahren sind jedoch auch für Citrat-Plasmen geeignet, wenn
- 20 der Rezeptur des Testträgers oder der Probe Calcium zugesetzt wird. Weiterhin ist es erfindungsgemäß möglich, neben der in den Beispielen genannten Methode der Aufbringung des Reagenzes auf die Elektroden (Aktivatoren und Substrat werden gemeinsam auf die Elektroden dosiert und anschließend getrocknet) das Reagenz nicht direkt auf die Elektroden, sondern in der Nähe der Elektroden, beispielsweise neben den
- 25 Elektroden auf einem flachen Substrat, aufzubringen und zu trocknen. In diesem Fall wird das Reagenz mit der Blutprobe während der Messung zu den Elektroden transportiert. Alternativ dazu ist es möglich, das Reagenz in porösen Materialien wie zum Beispiel Vliesen, Papieren, Membranen und dergleichen unterzubringen, beispielsweise ablösbar zu imprägnieren. Diese Materialien müssen dabei von der Blut-
- 30 oder Plasmaprobe vor dem Kontakt mit den Elektroden durchströmt werden und dabei das Reagenz aufnehmen. Es ist auch möglich, einzelne Bestandteile des Reagenzes auf unterschiedliche Kompartimente des Testträgers aufzubringen, beispielsweise das Thrombinsubstrat auf oder direkt neben die Elektrode, den Aktivator aber räumlich

getrennt davon (z.B. weiter entfernt von der Elektrode), oder beide Substanzen in unterschiedliche Schichten (z. B. Membranen oder Vliese) zu imprägnieren.

Beispiel 1:

Fertigung eines Gerinnungssensors für einen PT-Test

5 I. Beschreibung der elektrochemischen Funktion

- a) Offenes Zwei-Elektroden-System für „top-dosing“ Probenaufgabe. Ebener Aufbau mit 2 Pd-Elektroden. Auf eine Pd-Elektrode wird eine Ag/AgCl-Paste (Typ: Acheson Electrode 6037 SS) vollflächig dispensiert, so daß die gesamte Fläche dieser Pd-Elektrode von Ag/AgCl bedeckt ist.

- 10 Der elektrochemische Betrieb erfolgt quasi-potentiostatisch als 2-Elektroden-System, bei dem die Ag/AgCl Elektrode gleichzeitig als Referenz- und Gegenelektrode, die Pd-Elektrode als Arbeitselektrode geschaltet ist.

An dieses Zwei-Elektroden-System wird eine konstante Spannung angelegt und der Strom über der Zeit gemessen.

- 15 b) Ersatz der Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode durch eine lösliche an der Gegenelektrode reduzierbare Substanz („Mediator 2. Art“):

- Es wird eine lösliche reduzierbare Substanz eingesetzt, die an der Gegenelektrode Elektronen aufnimmt und damit den Stromtransport durch die Gegenelektrode gewährleistet. Gleichzeitig wird durch das Reduktionspotential dieser Substanz und durch die an den Sensor zwischen der Arbeits- und der Gegenelektrode angelegte konstante Spannung das an der Arbeitselektrode erreichbare Oxidationspotential begrenzt. Das an der Arbeitselektrode durch Oxidation nachzuweisende p-Aminoanilin muß innerhalb des erreichbaren Oxidationspotentials liegen. Das Potential an der Arbeitselektrode gegen eine hypothetische Silber-Silberchlorid-Bezugselektrode muß sich im beschriebenen Zweielektrodensystem so einstellen, daß der Strom durch die Arbeitselektrode (hier Anode) und der Strom durch die Gegenelektrode (hier Kathode) dem Betrag nach gleich sind. Die eingesetzte reduzierbare Substanz darf nicht gleichzeitig an der Arbeitselektrode innerhalb des maximal erreichbaren Oxidationspotentials oxidierbar sein, da sonst das Signal des durch die vorgelagerte enzymatische Reaktion abgespaltene p-Aminoanilin überlagert wird.
- 20
- 25
- 30

II. Herstellung eines trockenchemischen Sensors für einen PT Test

a) Rezeptur der Reagenzmasse:

Rezeptur 1: Ag/AgCl- Elektrodenausführung wie unter 1.I.a) beschrieben:

Konzentration (in Klammern: erfindungsgemäß möglicher Bereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591 (carboxylierte mikro- kristalline Zellulose)	Filmbildner	FMC-Corporation
2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
0,1% (0,01-1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
0,1µg/ml (0,01-2µg/ml)	rhTF (human recombinant Tissue factor)	Aktivator des extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Stago

Rezeptur 2: für den Einsatz des Mediators 2. Art gemäß 1.I.b)

Konzentration (in Klammern: erfindungsgemäß möglicher Bereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591 (carboxylierte mikro- kristalline Zellulose)	Filmbildner	FMC-Corporation
2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
0,1% (0,01-1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
0,1µg/ml (0,01-2µg/ml)	rhTF (human recombinant Tissue factor)	Aktivator des extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Stago
50 mM (1 – 250 mM)	p-Nitroso-Bis- Hydroxyethyl-anilin	Mediator 2. Art	Roche

b) Dosierung und Trocknung

5 Von diesen Suspensionen werden jeweils 5 µl auf die unter 1.I.a) und b)
beschriebenen Sensoren dosiert und auf einem Bandtrockner oder im
Trockenschrank bei 30 bis 50°C getrocknet. Rezeptur 1 eignet sich dabei für den
Sensor gemäß 1.I.a); Rezeptur 2 eignet sich für den Sensor gemäß 1.I.b).

10 c) Bei Verwendung des so erhaltenen Sensors zur Bestimmung der Blutgerinnung wird
eine Funktionskurve (Strom über Zeit), wie in Fig. 1 gezeigt, erhalten. Fig. 2 gibt
die Funktionskurve eines Sensors mit Referenzelektrode wieder.

Beispiel 2

Herstellung eines trockenchemischen Sensors für einen ACT Test:

a) Rezeptur der Reagenzmasse

Rezeptur (Alternative 1):

Konzentration (in Klammern: erfindungsgemäß möglicher Bereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591 (carboxylierte mikro- kristalline Zellulose)	Filmbildner	FMC-Corporation
2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
0,1% (0,01-1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
0,5%	Celite	Aktivator des intrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Sigma

Rezeptur (Alternative 2):

Konzentration	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
30 mg/ml	Succrose	Stabilisator	Sigma
10 mg/g	Gelatine	Filmbildner	American Gelatin
0,1 mg/ml	Triton X 100	Detergenz	Sigma
40 mg/ml	Glycin	Puffer	Roche
1%	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
0,1 µg/ml	rhTF (human recombinant Tissue factor)	Aktivator des extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Stago
3 mg/ml	Bovine Sulfatide	Aktivator des intrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Sigma

b) Dosierung und Trocknung

- Von jeweils einer dieser Suspensionen werden 5 µl auf dem unter 1. beschriebenen
- 5 Sensor (Variante 1 a, d.h. mit Ag/AgCl-Referenzelektrode) dosiert und auf einem Bandtrockner oder im Trockenschrank bei 30 bis 50°C getrocknet.

Beispiel 3:**Amplifikation des Meßsignals:**

- Aus dem Thrombinsubstrat wird durch Einwirkung der Gerinnungskaskade ein p-
- 10 Amino-anilin (Phenylendiamin) freigesetzt. Dieses wird an der Arbeitselektrode oxidiert und die dabei freiwerdenden Elektroden detektiert. Das primäre Oxidationsprodukt ist dabei ein Chinodiimin. Durch enzymatische Rückführung dieses Oxidationsprodukts in das Phenylendiamin durch eine Dye-Oxidoreductase z.B. Glucose- Dye-Oxidoreductase (GlucDOR) ist die erneute Oxidation an der Elektrode und damit eine Verstärkung des
- 15 ursprünglichen Signals möglich.

a) Rezeptur der Reagenzmasse:

Konzentration (in Klammern: erfindungsgemäß möglicher Bereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591 (carboxylierte mikro- kristalline Zellulose)	Filmbildner	FMC-Corporation
2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
0,1% (0,01-1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche Diagnostics
0,1µg/ml (0,01-2µg/ml)	RhTF (human recombinant Tissue factor)	Aktivator des extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Stago
1,2 KU/g (0,01-10 KU/g)	Glucose-Dye- Oxidoreductase (GlucDOR)	Enzym	Roche

Die für das „Amplifikationsenzym“ GlucDOR als Substrat notwendige Glucose ist Bestandteil der Probe (ca. 10 mM) und wurde deshalb nicht in die Rezeptur eingearbeitet. Glucosezusatz ist aber prinzipiell möglich.

b) Dosierung und Trocknung

Von dieser Suspension werden 5 µl auf dem unter 1.I.a. beschriebenen Sensor dosiert und auf einem Bandtrockner oder im Trockenschrank bei 30 bis 50°C getrocknet.

Beispiel 4:**Elektrochemischer ACT-Test****a) Testaufbau**

- Der in diesem Beispiel verwendete Testaufbau (Sensor) entsprach dem in 1.I.b)
 5 beschriebenen Sensor (Verwendung eines "Mediators 2. Art").

b) Rezeptur der Reagenzmasse

Konzentration (in Klammern: erfindungsgemäß möglicher Bereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591 (carboxylierte mikro- kristalline Zellulose)	Filmbildner	FMC-Corporation
2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
0,1% (0,01–1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
0,2 µg/ml (0,01 – 2µg/ml)	rhTF (human recombinant Tissue Factor)	Aktivator des extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Stago
6 mg/ml (0,5 - 50 mg/ml)	Bovine Sulfatide	Aktivator des intrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Life Science Reserach
50 mM (1 - 250 mM)	p-Nitroso.Bis- Hydroxyethylanilin	Mediator 2. Art	Roche

c) Dosierung und Trocknung

Von dieser Suspension wurden 5 µl auf den unter a) beschriebenen Sensor dosiert und auf einem Bandtrockner oder im Trockenschrank bei 30 bis 50 °C getrocknet.

d) Messergebnisse für den ACT-Test

- 5 Mit Vollblutproben, denen 1 bis 6 U Heparin je ml zugesetzt wurde ("Heparin-Spike"), wurde mit dem oben beschriebenen Sensor ein ACT-Test durchgeführt. Es wurde ein Potential von 300 mV angelegt und bei einem Schwellenwert von 0,5 µA die Zeit abgelesen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Heparin-Konzentration [U/ml]	Gerinnungszeit [s]
1	47
2	100
3	172
4	235
5	279
6	353

10 Beispiel 5:

Elektrochemischer aPTT-Test

a) Testaufbau:

Der in diesem Beispiel verwendete Testaufbau entsprach dem in Beispiel 1 unter 1.I.b) beschriebenen Aufbau.

b) Rezeptur der Reagenzmasse:

Konzentration (in Klammern: erfindungsgemäß möglicher Bereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591 (carboxylierte mikro- kristalline Zellulose)	Filmbildner	FMC-Corporation
2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
0,1% (0,01-1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
0,6 mg/ml (0,05-10 mg/ml)	Soy bean phosphatides	Aktivator des intrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Sigma
1 mg/ml (0,1-10 mg/ml)	Bovine Sulfatide	Aktivator des intrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Life Science Research
50 mM (1 – 250 mM)	p-Nitroso-Bis- Hydroxyethyl-anilin	Mediator 2. Art	Roche

c) Dosierung und Trocknung

Von dieser Suspension werden 5 µl auf dem unter 1.I.b) beschriebenen Sensor dosiert
5 und auf einem Bandtrockner oder im Trockenschrank bei 30 bis 50°C getrocknet.

d) Messergebnisse für den aPTT-Test

Mit Vollblutproben, denen 0 bis 0,35 U Heparin je ml zugesetzt wurde ("Heparin-
Spike"), wurde mit dem oben beschriebenen Sensor ein aPTT-Test durchgeführt. Es

wurde ein Potential von 300 mV angelegt und bei einem Schwellenwert von 0,5 μ A die Zeit abgelesen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Heparin-Konzentration [U/ml]	Gerinnungszeit [s]
0	59
0,15	79
0,25	117
0,35	164

Beispiel 6:

5 **Kompensation des Hämatokriteffekts**

I. Beschreibung der Methode:

Bei chronoamperometrischen oder voltammetrischen Meßverfahren ist der aus einer Oxidation oder Reduktion resultierende Strom bei Verwendung von Vollblut als Analyten vom Hämatokritgehalt abhängig. Bei Auswertemethoden, die auf eine vorgegebene Stromschwelle zur Bestimmung der Gerinnungszeit basieren, bekommt man so abhängig vom Hämatokritgehalt unterschiedliche Gerinnungszeiten.

Der Hämatokritgehalt läßt sich durch einen speziellen Meßalgorithmus quasi messen und zur Korrektur der Stromwerte heranziehen. Dazu wird vor der eigentlichen chronoamperometrischen Messung eine kurze Messung des Scheinwiderstandes des mit Blut benetzten Sensors durchgeführt. Hierzu wird zwischen Arbeits- und Gegenelektrode eine Wechselspannung mit einer Frequenz von 2 kHz und einer Amplitude von etwa 10 mV angelegt und der resultierende Effektivwert des durch den Sensor fließenden Wechselstroms gemessen. Durch Dividieren des Effektivwertes der angelegten Spannung mit dem Effektivwert des Wechselstroms erhält man den Scheinwiderstand Z des mit der Blutprobe befüllten Sensors. Dieser Scheinwiderstand Z ist abhängig von der Temperatur und dem Hämatokritgehalt des Blutes. Unter thermostatisierten isothermen Bedingungen läßt sich damit der Hämatokritgehalt im Blut unabhängig von der Konzentration des eigentlichen Elektronenüberträgers (Mediator) messen.

Mit folgender Formel lassen sich dann die Stromwerte der eigentlichen chronoamperometrischen Nachweismessung (i_{mess}) korrigieren um so vom Hämatokritgehalt unabhängige Ergebnisse (i_{korrr}) zu erhalten :

$$i_{\text{korrr}} = i_{\text{mess}} \times ((Z - Z_{\text{median}}) \times 0.001 + 1)$$

- 5 wobei Z der Scheinwiderstand der aktuellen Messung und Z_{median} der Scheinwiderstand aus der Mitte vieler Blutproben ist und sich als Ergebnis einer Chargenkalibration ergibt.

II. Versuchsdurchführung

II.1 Herstellung des trockenchemischen Formats für den verwendeten PT-Test:

- Die Kompensation des Hämatokriteffekts wurde am Beispiel eines PT-Tests gezeigt. Der
 10 in diesem Beispiel verwendete Testaufbau entsprach dem in Beispiel 1 unter Ib) beschriebenen Aufbau. Die verwendete Rezeptur war identisch mit der in Beispiel 1 unter II a) aufgeführten Rezeptur 2.

II.2. Einstellung der Hämatokritwerte

- 15 Frisches Venenblut wurde auf dem Eisbad auf 0°C gekühlt. Aliquots wurden in einer Tischzentrifuge in Erythrozyten und Zellpellet getrennt. Höhere Hämatokrite wurden durch Entfernen eines Teils des Plasmas und Resuspension der Zellen in dem verbliebenen Plasma eingestellt. Niedrigere Hämatokrite wurden durch Zufügen von Plasma, das aus einem anderen Aliquot desselben Blutes wie beschrieben gewonnen worden war, eingestellt.

- 20 Die Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Hämatokrit [%]	Gerinnungszeiten [s]	
	unkorrigiert	korrigiert
35	39	52
45	45	53
65	78	56

Beispiel 7:**Voltammetrische Methode**

Neben dem beschriebenen amperometrischen Meßverfahren können auch voltammetrische Meßverfahren eingesetzt werden. Es wird keine konstante Spannung zwischen den Elektroden geregelt, sondern die Spannung wird linear von einem Startwert zu einem Endwert verändert und anschließend wieder zum Startwert zurück gefahren. Dieser Vorgang wird mehrfach über die gesamte Meßdauer wiederholt. Bei diesem Verfahren wird dann der Strom gegen die Spannung aufgetragen und man erhält dann entsprechend den Wiederholungen in einander geschachtelte Strom-Spannungskurven (Zyklovoltamogramme). Bei geeignetem Spannungsbereich bilden sich Oxidationspeaks und Reduktionspeaks des Elektronenüberträgers in diesen Kurven ab.

In Fig. 2 ist ein Beispiel für solche aufeinanderfolgende Voltamogramme dargestellt. Es wurde ein Potentialbereich von 100 bis 600 mV und zurück über die gesamte Meßdauer wiederholt durchlaufen.

Die Höhe dieser Peaks ist direkt proportional der Konzentration des Elektronenüberträgers, sofern nicht weitere redox aktive Substanzen im überdeckten Potentialbereich mitoxidiert oder mitreduziert werden und damit einen zusätzlichen Strombeitrag liefern. Bei der Messung einer Konzentrationsänderung kann eine solche Störung gegebenenfalls vernachlässigt werden.

Trägt man nun die Stromwerte der Peak-Maxima oder die durch die Kurven eingeschlossenen Fläche (Ladungsumsatz) der einzelnen Strom-Spannungsschleifen über die Zeit auf, erhält man ebenfalls ein Bild der Konzentrationsänderung des Elektronenüberträgers über die Meßdauer in einem durch die Zyklusdauer gegebenen Zeitraster. In Fig. 3 ist der Ladungsinhalt (Summe der Stromwerte / Meßdichte) der aufeinanderfolgenden zyklischen Voltamogramme über die Zeit dargestellt. Deutlich ist der Verlaufsunterschied zwischen dem Normalen Gerinnungsbereich und dem Ergebnis bei einem Marcumar-Probanden (mit verlangsamter Blutgerinnung) zu erkennen.

Zur Bestimmung bzw. zum Ablesen einer „Gerinnungszeit“ interessiert in erster Linie der Zeitpunkt, wann die Ladung eines zyklischen Voltamogramms anfängt, zu steigen und wie schnell dieses geschieht. Das bedeutet also, wann startet die Gerinnung

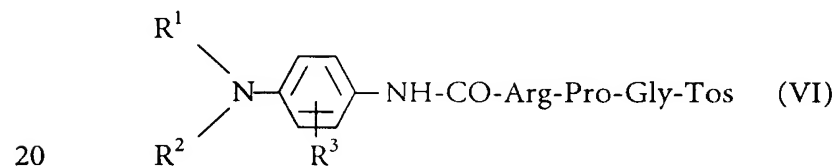
- (Thrombin ist aktiviert) und wie schnell läuft diese ab (wie schnell wird wieviel Thrombin zusätzlich aktiviert). Aus diesem Grund wird wie in Fig. 4 dargestellt, die zeitliche Ableitung aus den Kurven von Fig. 3, also dQ nach dt gebildet. Das Maximum der Steigung ist in der zeitlichen Ableitung das Maximum. Die Zeit t des Maximums
- 5 kann als Gerinnungszeit abgelesen werden.

Für die in den Figuren 3 und 4 dargestellten Beispiele erhält man dann folgendes Ergebnis:

	Zeit zum Maximum dQ/dt	
Messung	Normalbereich	Marcumar Proband
1	74	208
2	70	200
3	72	196
4	74	200
5	72	196
6	74	188
7	74	208
8	74	216
9	74	204
10	74	234
11	76	218

Patentansprüche

1. Elektrochemischer Sensor auf trockenchemischer Basis zur Bestimmung der Blutgerinnung oder einzelner Gerinnungsfaktoren, der auf einem inerten Träger mindestens zwei Elektroden aufweist, sowie ein trockenes Reagenz, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz ein Proteasesubstrat enthält, das aus einem Peptidrest besteht, der von einer Protease des Blutgerinnungssystems abgespalten werden kann, und über das Carboxylende amidisch an substituierte Aniline, insbesondere an einen Phenylendiaminrest gebunden ist.
2. Elektrochemischer Sensor gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er zwei Elektroden enthält, die aus dem gleichen Material bestehen.
3. Elektrochemischer Sensor gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Elektrodenmaterial Palladium ist.
4. Elektrochemischer Sensor gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease Thrombin und das Proteasesubstrat ein Thrombinsubstrat ist.
5. Elektrochemischer Sensor gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Thrombinsubstrat eine Verbindung der Formel VI ist,



wobei

R1 einen Alkylrest oder Wasserstoff,

R2 einen Hydroxyalkylrest oder Wasserstoff und

R3 Wasserstoff, Halogen, Alkoxy oder Alkylthio bedeutet.

6. Elektrochemischer Sensor gemäß einem der Ansprüche 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz auch eine Dye-Oxidoreductase enthält, die in der Lage ist, die Umsetzung eines Chinodiimins in ein Phenylendiamin zu katalysieren.

7. Elektrochemischer Sensor gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Dye-Oxidoreductase Glucose-Dye-Oxidoreductase ist.
8. Blutgerinnungsmeßsystem enthaltend einen elektrochemischen Sensor und ein Strommeßgerät, dadurch gekennzeichnet, daß als Sensor ein Sensor gemäß einem
5 der Ansprüche 1 – 7 verwendet wird.
9. Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung mittels eines elektrochemischen Sensors, dadurch gekennzeichnet, daß an einen Sensor gemäß einem der Ansprüche 1 - 7 eine konstante Spannung angelegt, die zu untersuchende Blutprobe so auf den Sensor aufgegeben wird, daß das Reagenz und die Elektroden befeuchtet werden
10 und der zwischen den Elektroden fließende Strom über die Zeit gemessen wird.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß damit die Prothrombinzeit (PT), die aktivierte partielle Prothrombinzeit (aPTT) oder die „activated clotting time“ (ACT) gemessen wird.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß bei der
15 Bestimmung der Blutgerinnungszeit eine Korrektur des Hämatokriteinflusses über eine Impedanzmessung erfolgt.
12. Reagenz zur Bestimmung der Blutgerinnung enthaltend ein Proteasesubstrat, das aus einem Peptidrest besteht, der von einer Protease des Blutgerinnungssystems abgespalten werden kann und über das Carboxylende amidisch an einen
20 Phenylendiaminrest gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Dye-Oxidoreductase enthält.
13. Reagenz gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Dye-Oxidoreductase Glucose-Dye-Oxidoreductase ist.
14. Reagenz gemäß Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease
25 Thrombin und das Proteasesubstrat ein Thrombinsubstrat ist.
15. Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung mittels eines elektrochemischen Sensors, dadurch gekennzeichnet, daß an einen Sensor gemäß einem der Ansprüche 1 - 7 eine sich linear ändernde Spannung angelegt, die zu untersuchende Blutprobe so auf den Sensor aufgegeben wird, daß das Reagenz und die Elektroden befeuchtet

werden und der zwischen den Elektroden fließende Strom über die Zeit gemessen wird.

16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Bestimmung der Blutgerinnungszeit eine Korrektur des Hämatokriteinflusses über eine
- 5 Impedanzmessung erfolgt.

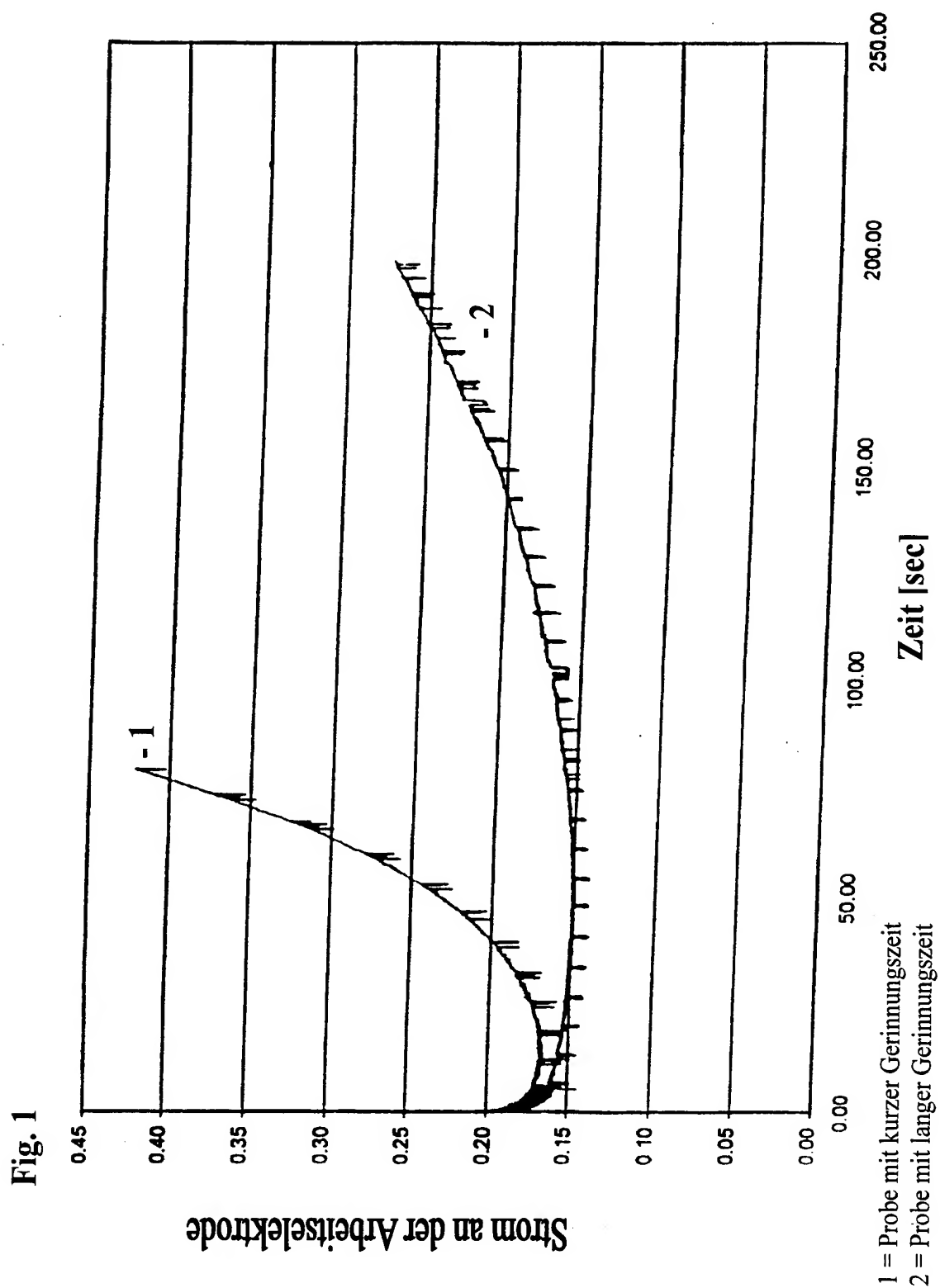


Fig. 2

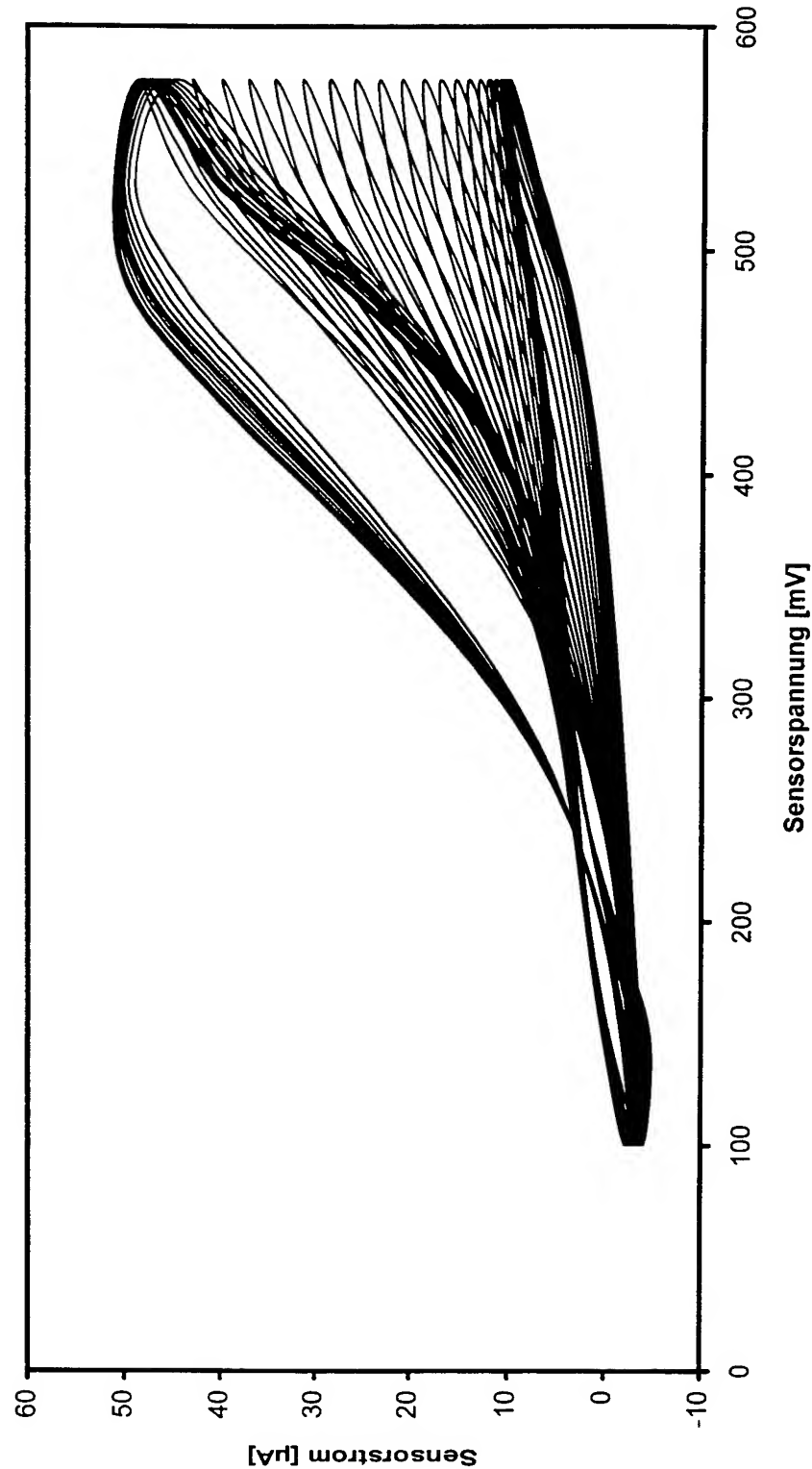
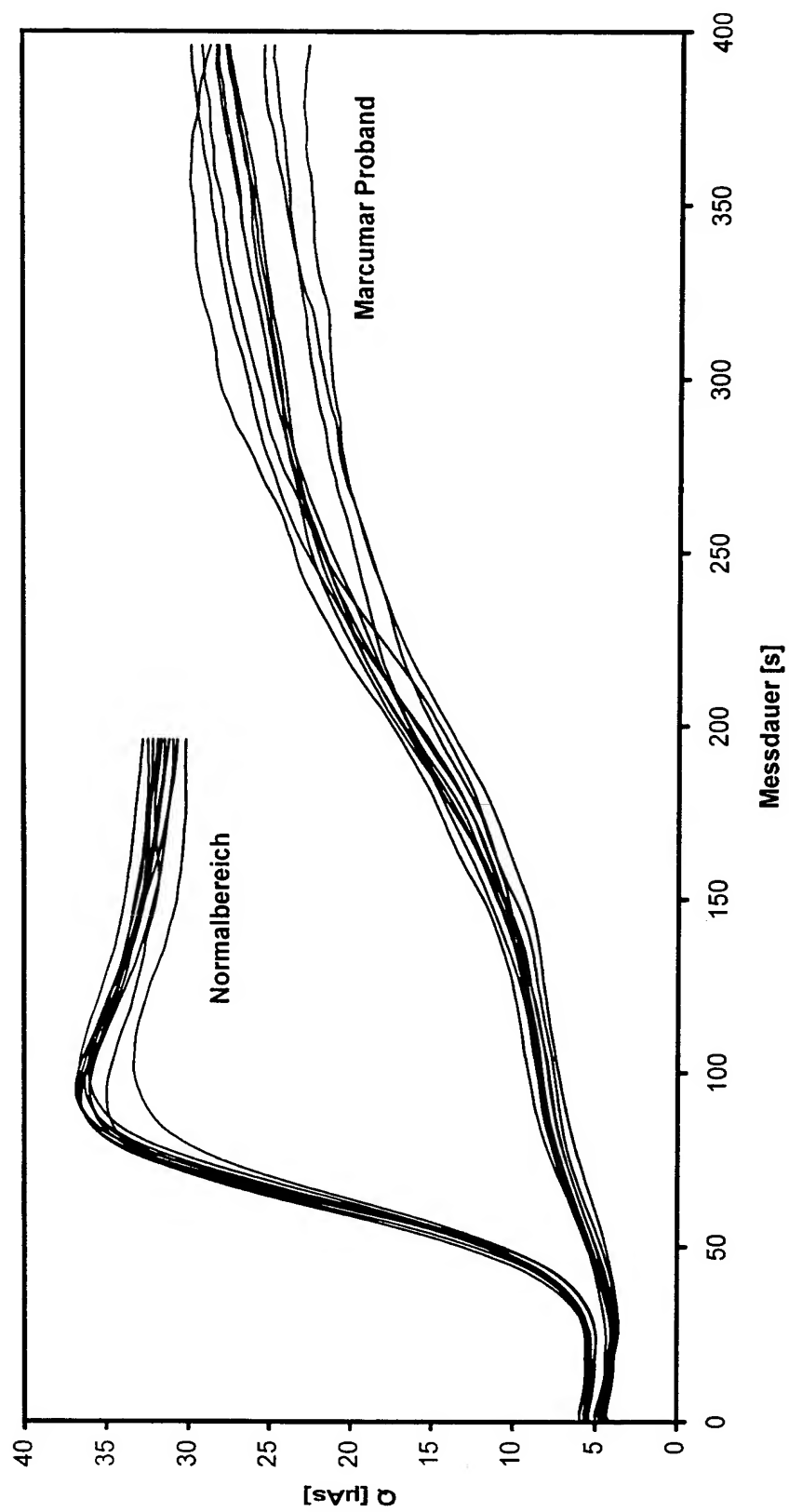


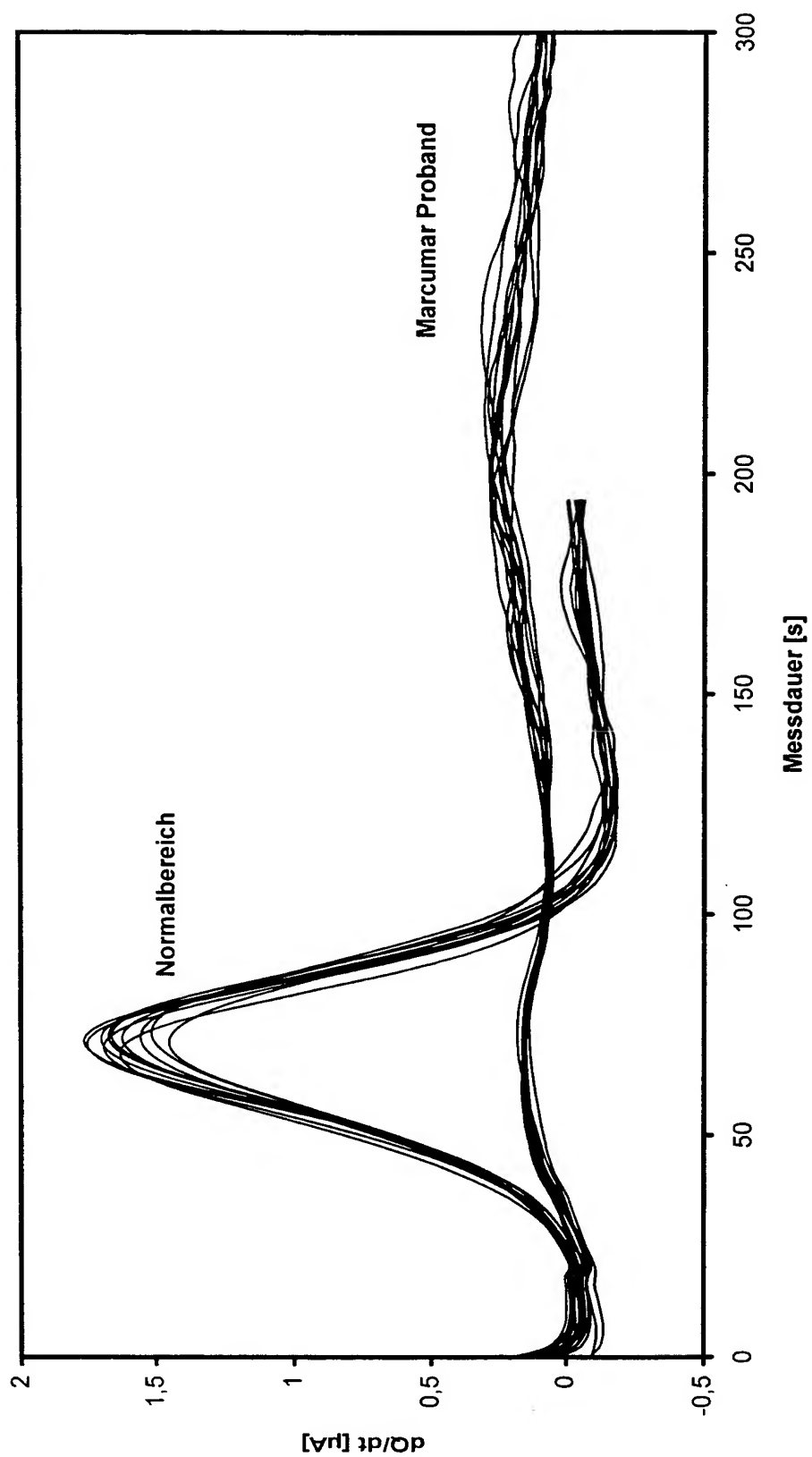
Fig. 3

3/4
Fig. 3



4 / 4

Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/01848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N27/327 G01N33/86 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	EP 1 031 830 A (ASULAB SA) 30 August 2000 (2000-08-30) abstract page 1, paragraph 2 page 5, line 1 - line 43 ----	1-16
X	ARWIN, HANS ET AL: "Thrombin activity measured with a new electric method" FEBS LETT. (1976), 64(1), 95-7 , XP000995397 page 95, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 1 page 95, right-hand column, last paragraph page 96, right-hand column, paragraph 2 page 97, right-hand column ----- -/--	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 2001

Date of mailing of the international search report

09/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luis Alves, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. tional Application No

PCT/EP 01/01848

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>RANDRIAMABAZAKA, H. N. ET AL: "Voltammetric assay of thrombin adsorbed on the carbon paste electrode." ELECTROANALYSIS, (1993) VOL. 5, NO. 3, PP. 231-241. , XP000995661 abstract page 231, left-hand column, paragraph 2 -page 232, right-hand column, paragraph 2 page 235, right-hand column, paragraph 3 -page 240, right-hand column, last paragraph</p> <p>----</p>	1-16
A	<p>US 4 304 853 A (NIGRETTO JEAN M ET AL) 8 December 1981 (1981-12-08) cited in the application abstract column 1, line 56 -column 3, line 14; example IX</p> <p>----</p>	1-16
A	<p>DE PEURIOT, M. DARAIO ET AL: "The electrochemical activity determination of trypsin-like enzymes. V. A comparative study of the electrochemical oxidation of the marker, p-aminodiphenylamine, and of electrogenic substrates in human plasma, whole blood, and aqueous solutions" J. ELECTROCHEM. SOC. (1981), 128(6), 1233-8 , XP000995360 page 1233, left-hand column, paragraph 3 -page 1234, left-hand column, paragraph 4</p> <p>----</p>	1-16
A	<p>WO 98 39643 A (DIAMETRICS) 11 September 1998 (1998-09-11) page 2, paragraph 2 -page 4, line 21</p> <p>-----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/01848

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1031830 A	30-08-2000	AU 1849700 A JP 2000241384 A NO 20000862 A	24-08-2000 08-09-2000 24-08-2000
US 4304853 A	08-12-1981	FR 2455083 A FR 2471410 A CA 1149019 A DE 3061860 D EP 0018002 A JP 1261556 C JP 55144899 A JP 59035598 B	21-11-1980 19-06-1981 28-06-1983 17-03-1983 29-10-1980 25-04-1985 12-11-1980 29-08-1984
WO 9839643 A	11-09-1998	AU 6681298 A US 6150174 A	22-09-1998 21-11-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01848

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N27/327 G01N33/86 C12Q1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	EP 1 031 830 A (ASULAB SA) 30. August 2000 (2000-08-30) Zusammenfassung Seite 1, Absatz 2 Seite 5, Zeile 1 - Zeile 43 ---	1-16
X	ARWIN, HANS ET AL: "Thrombin activity measured with a new electric method" FEBS LETT. (1976), 64(1), 95-7 , XP000995397 Seite 95, linke Spalte, Absatz 2 -rechte Spalte, Absatz 1 Seite 95, rechte Spalte, letzter Absatz Seite 96, rechte Spalte, Absatz 2 Seite 97, rechte Spalte --- -/-	1-16

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. April 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/05/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Luis Alves, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>RANDRIAMABAZAKA, H. N. ET AL: "Voltammetric assay of thrombin adsorbed on the carbon paste electrode." ELECTROANALYSIS, (1993) VOL. 5, NO. 3, PP. 231-241. , XP000995661 Zusammenfassung Seite 231, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 232, rechte Spalte, Absatz 2 Seite 235, rechte Spalte, Absatz 3 -Seite 240, rechte Spalte, letzter Absatz ---</p>	1-16
A	<p>US 4 304 853 A (NIGRETTO JEAN M ET AL) 8. Dezember 1981 (1981-12-08) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Spalte 1, Zeile 56 -Spalte 3, Zeile 14; Beispiel IX ---</p>	1-16
A	<p>DE PEURIOT, M. DARAIO ET AL: "The electrochemical activity determination of trypsin-like enzymes. V. A comparative study of the electrochemical oxidation of the marker, p-aminodiphenylamine, and of electrogenic substrates in human plasma, whole blood, and aqueous solutions" J. ELECTROCHEM. SOC. (1981), 128(6), 1233-8 , XP000995360 Seite 1233, linke Spalte, Absatz 3 -Seite 1234, linke Spalte, Absatz 4 ---</p>	1-16
A	<p>WO 98 39643 A (DIAMETRICS) 11. September 1998 (1998-09-11) Seite 2, Absatz 2 -Seite 4, Zeile 21 -----</p>	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören .

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01848

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 1031830	A	30-08-2000	AU	1849700 A	24-08-2000
			JP	2000241384 A	08-09-2000
			NO	20000862 A	24-08-2000
US 4304853	A	08-12-1981	FR	2455083 A	21-11-1980
			FR	2471410 A	19-06-1981
			CA	1149019 A	28-06-1983
			DE	3061860 D	17-03-1983
			EP	0018002 A	29-10-1980
			JP	1261556 C	25-04-1985
			JP	55144899 A	12-11-1980
			JP	59035598 B	29-08-1984
WO 9839643	A	11-09-1998	AU	6681298 A	22-09-1998
			US	6150174 A	21-11-2000